UNIVERSITE DE LAUSANNE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

FACULTE DE MEDECINE
Directeur : Professeur H. ISLIKER

DOSAGE DE L'ACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-PEROXIDASE DE RAIFORT PAR LA METHODE AU SULFATE D'AMMONIUM ET INFLUENCE DE DEUX TUMEURS PLASMOCYTAIRES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE DE LA SOURIS

Résumé de la THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

Rolando SEEMATTER

médecin diplômé de la Confédération Suisse

originaire de SAXETEN (Berne)

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

UNIVERSITE DE LAUSANNE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

FACULTE DE MEDECINE
Directeur : Professeur H. ISLIKER

DOSAGE DE L'ACTIVITE DES ANTICORPS ANTI-PEROXIDASE DE RAIFORT PAR LA METHODE AU SULFATE D'AMMONIUM ET INFLUENCE DE DEUX TUMEURS PLASMOCYTAIRES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE DE LA SOURIS

Résumé de la THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

Rolando SEEMATTER

médecin diplômé de la Confédération Suisse

originaire de SAXETEN (Berne)

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

IMPRIMATUR

UNIVERSITE DE LAUSANNE

FACULTE DE MEDECINE

Le Conseil de la Faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de Messieurs les professeurs H. Isliker et L. Freedman, et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée : "Dosage de l'activité des anticorps anti-péroxidase de Raifort par la méthode au sulfate d'ammonium et influence de deux tumeurs plasmocytaires sur la réponse immunitaire humorale de la souris", présentée par Monsieur Rolando Seematter, médecin diplômé de la Confédération Suisse, pour l'obtention du grade de docteur en médecine.

Lausanne, le 26 mai 1976.

Le Doyen :
Prof. G. Candardjis

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tirés à part des Annales d'Immunologie : tome 127 C, année 1976, No 1

Vol. 127 C — N° 1 JANVIER 1976

ANNALES
D'IMMUNOLOGIE

DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DES ANTICORPS ANTI-PEROXYDASE DE RAIFORT PAR LA MÉTHODE AU SULFATE D'AMMONIUM

par **R. Seematter** et **H. Jaquet**

Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne
(Directeur : Pr H. Isliker), *Lausanne (Suisse)*

SUMMARY

Assay of the activity of horseradish peroxidase antibodies using ammonium sulfate technique

The antigen binding capacity (ABC) of mouse and rabbit antisera to horseradish peroxidase (HRP) was measured by the Farr technique, originally introduced for bovine serum albumin. Results obtained by this method are independent of other antibody interactions (precipitation, formation of immune complexes, effect on enzyme activity). Commercially available HRP has variable solubility in ammonium sulfate solutions; almost 40 % was precipitated at 50 % saturation. Accordingly, the fraction of HRP soluble at 60 % saturation was used, and this was labelled with $^{125}I_2$ using the HRP oxidizing activity. Under these test conditions, accurate and reproducible results were obtained with protein concentrations (as N/ml) of the order of 0.07 μg (antibody) and 0.01 μg (antigen) respectively. This high sensitivity is superior to that achieved by passive hemagglutination, especially when titrating antibody levels in mouse sera.

Manuscrit reçu le 1er août 1975, accepté le 30 décembre 1975.

KEY-WORDS: Peroxidase, Antigen-antibody complexe, Ammonium sulfate; Horseradish, Labelling, Mouse, Rabbit, Assay, Antigen binding capacity.

INTRODUCTION

La peroxydase de raifort, par ses caractéristiques histochimiques permet la visualisation des anticorps qu'elle induit, en microscopie optique et électronique, dans les tissus des animaux immunisés par cette enzyme [5, 6, 12, 10].

L'emploi de cet antigène nécessite des méthodes de dosage des anticorps produits. Différentes méthodes ont été proposées : l'hémagglutination passive [1], le dosage par inhibition de l'activité enzymatique qu'un immunsérum peut provoquer [11] et la mesure de l'activité enzymatique que les anticorps entraînent après incubation et précipitation par du sulfate d'ammonium (SA) à 33 % de saturation [4].

Dans ce travail, nous proposons une adaptation à la peroxydase de raifort de la méthode mise au point par Farr [3] pour l'albumine, de façon à mesurer l'avidité (antigen binding capacity, ABC), des anticorps anti-peroxydase dans le sens proposé par cet auteur [8].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

a) *Animaux.*

L'immunsérum de souris provient de souris C3H/He immunisées avec de la peroxydase de raifort « Purissima » (Fluka). L'immunisation primaire consiste en 75 µg de peroxydase dans de l'adjuvant de Freund complet, puis le rappel en 15 µg dans de l'adjuvant de Freund incomplet, injectés dans le péritoine des souris à trois semaines d'intervalle.

L'immunsérum de lapin est obtenu après trois immunisations mensuelles successives. On a fait chaque immunisation par voie sous-cutanée, en répartissant dans les quatre coussinets plantaires 100 µg de peroxydase mélangés à de l'adjuvant de Freund complet la première fois, puis incomplet lors des deux rappels. Cet immunsérum collecté au cours du 4e et du 5e mois contient 2 mg/ml d'anticorps précipitants.

b) *Préparation de la peroxydase soluble.*

Environ 40 % de la peroxydase commerciale précipite dans un milieu contenant du SA à 50 % de saturation ; pour cette raison, afin de sélectionner les molécules les plus solubles avec une marge de sécurité, nous utilisons le surnageant après relargage avec SA à 60 % de saturation. L'enzyme est précipitée avec SA à 60 %

ABC = avidité (antigen binding capacity).
HRP = peroxydase de raifort (horseradish peroxidase).
SA = sulfate d'ammonium.

de saturation dans du tampon borate pH 8,3 (acide borique 0,1 M ; borax 0,025 M ; NaCl 0,075 M) contenant 0,2 % d'IgG bovine comme co-précipitant, ce qui équivaut à la concentration de globulines présentes lors du test. Le surnageant contient 20 % de la peroxydase engagée ; il est exempt d'IgG bovine détectable par double immunodiffusion selon Ouchterlony avec un immunsérum anti-IgG bovine.

c) *Marquage de la peroxydase par* ^{125}I.

Par son activité enzymatique, la peroxydase de raifort est capable d'ioder des protéines, elle peut alors également s'ioder elle-même [9]. Nous avons mis en présence 2 mg de peroxydase de raifort avec 2 mCi de ^{125}I libre de transporteur (Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen), dans 2 ml de tampon phosphate, 0,05 M, pH 6 ; on réalise alors une incubation de 40 minutes à la température ambiante en ajoutant 2 fois 5 µg de H_2O_2 à 20 minutes d'intervalle. L'élimination de l'iode libre se fait par dialyse. Nous avons contrôlé chaque fois le taux de fixation par précipitation de la protéine dans l'acide trichloracétique. Le rendement obtenu est de 3 %. Nous avons pu améliorer le rendement par d'autres méthodes, mais une partie de la peroxydase est chaque fois devenue insoluble dans SA.

d) *Incubation et précipitation de l'antigène et de l'anticorps.*

L'immunsérum est dilué de 3 en 3 à partir de la dilution à 1/10 dans du tampon borate pH 8,3 additionné de sérum normal, à raison de 10 %, de façon que chaque tube contienne la même quantité de protéines. A 0,5 ml de chacune de ces dilutions, on ajoute 0,5 ml de peroxydase marquée diluée dans le tampon borate à la concentration de 0,02 µg N/ml. On incube pendant une nuit à 4° C et on précipite ensuite les complexes au moyen de SA à 86 % de saturation mélangé rapidement à parts égales, pour obtenir un milieu à 43 % de saturation. On incube durant 30 minutes avant de centrifuger, puis on effectue deux lavages successifs dans du SA à 43 %. Toutes ces opérations se font à 4°.

La radioactivité des culots est mesurée par la suite avec un compteur proportionnel « Nuclear Chicago ».

La précipitation non spécifique est mesurée avec un sérum normal, alors que la précipitation maximale correspond en général au 81 % de l'activité ajoutée ; la précipitation non spécifique ne doit pas dépasser le 9 %.

Pour déterminer le titre, nous avons calculé la radioactivité mesurable dans le culot pour une précipitation spécifique de 33 % d'antigène ; cette valeur est rapportée dans un graphique des radioactivités mesurées (fig. 1). Avec ce titre, on peut ensuite calculer la quantité d'antigène qui serait entraînée par 1 ml d'immunsérum dans des conditions d'excès d'antigène où seulement le 33 % de l'antigène présent serait lié pour une dilution donnée. Cette quantité est une mesure de l'ABC, et ABC-33/0,01 signifie que seulement 33 % de l'antigène sont précipités pour une concentration de 0,01 µg en N/ml d'antigène présenté. Dans le cas du sérum de lapin présenté dans la figure 1, le titre de 1/7.290 permet de calculer une ABC-33/0,01 de 23,9 µg N/ml.

RÉSULTATS

Précipitation des complexes antigènes-anticorps à différentes concentrations de sulfate d'ammonium

La figure 2 permet de comparer la précipitation de la peroxydase (préparée et marquée pour le test) à différentes concentrations de SA, soit en présence d'un immunsérum anti-peroxydase assez dilué pour former

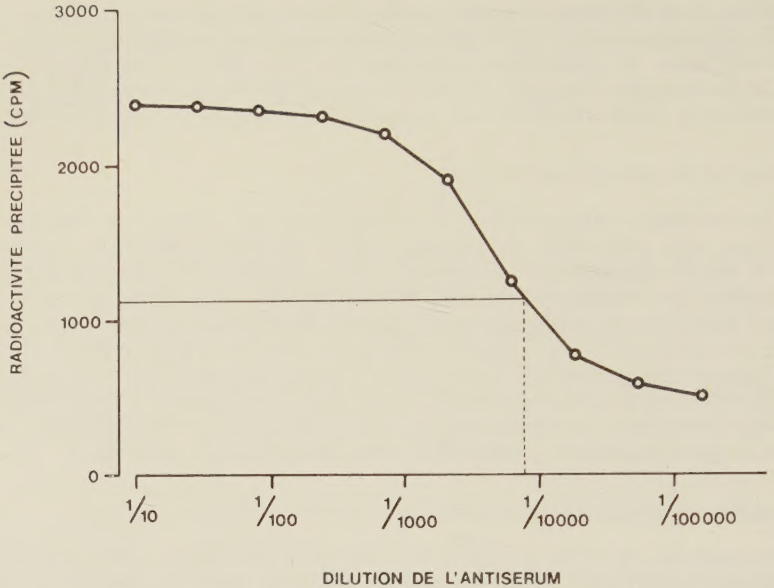

FIG. 1. — *Activité de sérum anti-peroxydase de lapin.* Les complexes solubles contenant la peroxydase marquée par ^{125}I sont précipités par SA à 43 % de saturation. Le titre de sérum est indiqué par le point d'intersection avec l'ordonnée qui correspond à une précipitation spécifique de 33 % d'antigène.

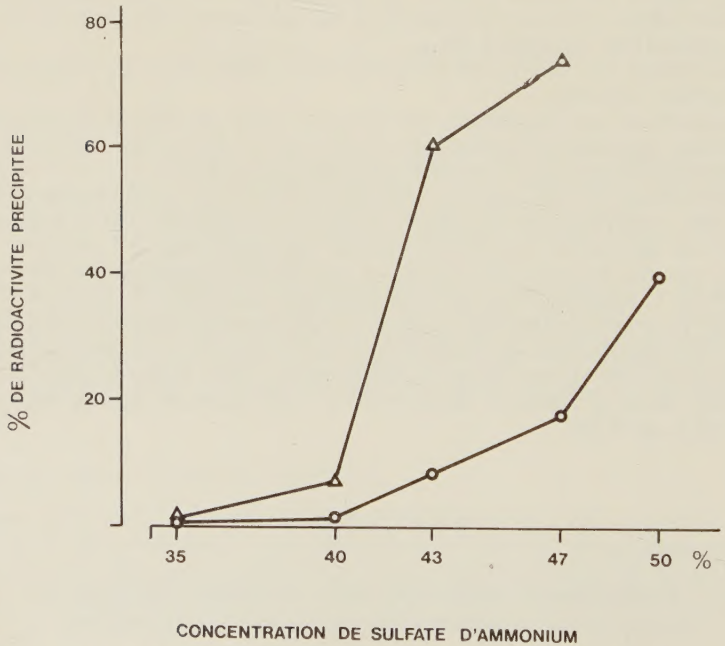

FIG. 2. — *Précipitation de complexes solubles en fonction de la concentration de SA.* La peroxydase est marquée par ^{125}I.

Δ——Δ : précipitation spécifique en présence d'un sérum anti-peroxydase de lapin ;
o——o : précipitation non spécifique en présence d'un sérum normal de lapin.

des complexes solubles avec cet antigène, soit en présence d'un sérum normal. Dans les deux cas, les conditions du test sont celles décrites dans « Matériel et Méthodes ». On peut voir que la précipitation de l'antigène en présence de l'anticorps s'abaisse progressivement jusqu'à une saturation de 43 %. Cette concentration de SA donne le maximum de précipitation spécifique pour un minimum de précipitation non spécifique.

Il est à noter que la solubilité de la peroxydase varie selon les lots et que la saturation optimale de SA doit être contrôlée pour chaque lot après relargage.

b) *Affinité comparée des anticorps anti-peroxydase pour la peroxydase iodée après relargage et la peroxydase d'origine*

Il est nécessaire de s'assurer que le relargage et l'iodination ne modifient pas les propriétés de la peroxydase. Si l'antigénicité n'est pas modifiée par le relargage ou l'iodination, l'inhibition de la précipitation spécifique de la peroxydase marquée par la peroxydase telle quelle, employée pour l'immunisation, doit être dans un rapport équimolaire.

L'expérience représentée dans la figure 3 consiste à mettre en présence une aliquote d'immunsérum et une quantité fixe d'antigène composée de peroxydase marquée et non marquée mélangées dans des proportions variables. Comme on peut le voir, l'immunsérum entraîne la peroxydase marquée dans la même proportion où elle se trouve dans l'aliquote présentée ; autrement dit, l'inhibition de la précipitation de la peroxydase marquée par la peroxydase non relarguée se fait suivant un rapport de 1, les deux ligands se comportant d'une manière identique.

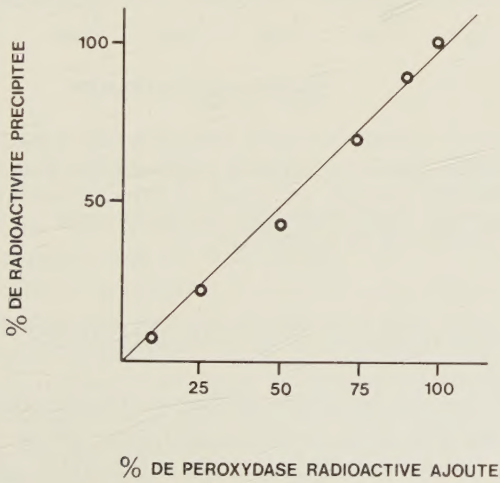

FIG. 3. — *Précipitation par un sérum anti-peroxydase d'une même aliquote d'antigène contenant de la peroxydase originale et de la peroxydase relarguée et marquée.* La proportion de peroxydase relarguée et marquée varie de 0 à 100 %.

c) *Comparaison des précipitations obtenues avec SA et avec un immunsérum anti-IgG*

Pour nous assurer que SA précipite bien tous les complexes antigène-anticorps, on peut comparer la courbe de précipitation obtenue avec SA et celle obtenue par précipitation des anticorps, après incubation avec la peroxydase, au moyen d'un immunsérum anti-IgG.

La précipitation avec l'anti-IgG est réalisée de la façon suivante. On incube pendant 48 heures, à 4°, les mélanges antigènes-anticorps avec une partie aliquote d'immunsérum anti-IgG suffisante pour précipiter toutes les IgG ; ensuite, on procède à une première centrifugation, puis à un lavage du culot avec NaCl 0,9 %. Comme précédemment pour SA, le 100 % de précipitation spécifique est obtenu avec un sérum hyperimmun. La figure 4 montre les courbes de précipitation obtenues selon les deux méthodes avec le même sérum de souris ; on peut constater qu'elles se superposent.

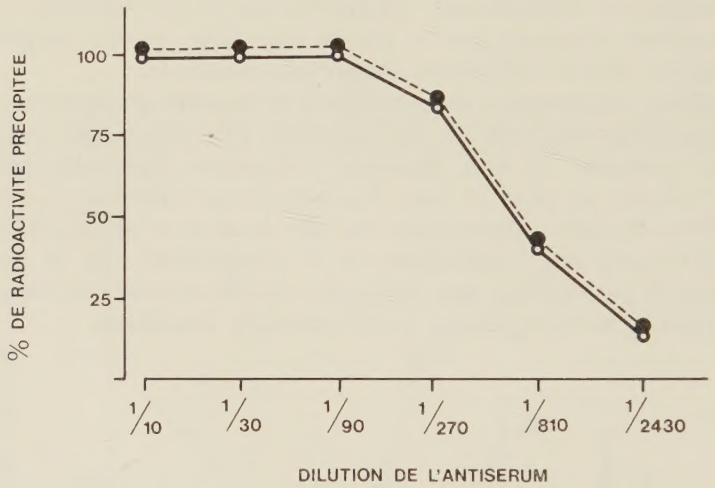

Fig. 4. — *Activité d'un sérum anti-peroxydase de lapin.*

La précipitation des complexes solubles au moyen de SA est comparée à la précipitation au moyen d'un sérum anti-IgG de lapin.

o——o : précipitation par un sérum de mouton anti-IgG de lapin ;

●-------● : précipitation par SA à 43 % de saturation.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

En considérant que la première dilution d'immunsérum utilisée est de 1/10, on peut calculer que, pour un antigène dilué à 0,01 µg N/ml, l'ABC la plus faible qui puisse être mesurée est de 0,07 µg N/ml d'immunsérum.

D'après cette méthode, l'ABC-33/0,01 d'un immunsérum de lapin contenant 2 mg/ml d'anticorps précipitants est de 64,4 µg N/ml ; ce même

immunsérum testé par hémagglutination passive selon Avraméas [5] donne un titre de 1/500. Dans ce cas donc, les deux méthodes semblent comparables. Cependant, en ce qui concerne les sérums anti-peroxydase de souris, l'hémagglutination passive ne nous a pas toujours donné de tels titres, alors que nous avons obtenu des ABC cohérentes dans chaque cas.

Dès lors qu'un fort pourcentage de peroxydase de raifort précipite dans SA, il devient nécessaire d'isoler une peroxydase soluble, obtenue dans notre cas par relargage en SA à 60 % de saturation. Après marquage de cette peroxydase soluble, on peut constater, par des expériences d'inhibition, que les anticorps ne la distinguent pas de l'antigène servant à l'immunisation. Pour la précipitation des complexes solubles, nous avons choisi de le faire en milieu SA à 43 % de saturation; en effet, à cette concentration, on précipite tous les complexes antigène-anticorps alors que la précipitation non spécifique est minimale. Si on compare ce mode de précipitation avec ce que nous obtenons avec un immunsérum anti-IgG, nous pouvons observer que les résultats des deux méthodes sont similaires, ce qui confirme que, à 43 %, SA précipite bien tous les complexes.

Cette modification de la méthode de Farr n'est pas la première en son genre. Cerottini [2] a mis au point un test d'ABC des anticorps anti-Fc. Dans ce test, la faible solubilité du Fc en SA fait que les complexes antigène-anticorps précipitent avec SA à 40 % de saturation. Ce test a été repris par Longmine [7]. Cette méthode permet donc de déterminer l'ABC selon un procédé similaire à celui proposé par Farr [3] pour l'albumine. De même que dans le procédé Farr, dans cette méthode on utilise une mesure de l'interaction primaire antigène-anticorps en dehors de la formation de réseaux et on fait aussi intervenir une appréciation de l'avidité des anticorps. En effet, la variation de l'ABC, mesurée avec différentes concentrations d'antigène, est d'autant plus forte que l'avidité de l'anticorps est faible pour autant qu'on choisisse des concentrations d'antigène appropriées [8].

RÉSUMÉ

Pour estimer le pouvoir d'un immunsérum de souris anti-peroxydase de raifort, nous avons mesuré la capacité des anticorps de se lier à la peroxydase marquée à ^{125}I (Antigen Binding Capacity) suivant la méthode décrite par Farr pour le cas de l'albumine.

L'avantage de cette technique est de ne faire intervenir ni le pouvoir agglutinant ou précipitant des anticorps, ni l'effet que ceux-ci pourraient avoir sur l'activité enzymatique de la peroxydase. La solubilité relativement faible de la peroxydase dans le sulfate d'ammonium a nécessité une préparation préalable de cet antigène après relargage. Le marquage à l'iode radioactif de la peroxydase ainsi préparée a été effectué par l'utilisation de sa propre activité enzymatique.

Mots-clés : Peroxydase, Sulfate d'ammonium, Complexe antigène-anticorps ; Raifort, Marquage, Souris, Lapin, Dosage, Avidité.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à une subvention du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (3.605.71).

Les discussions au cours de ce travail avec le Dr J. C. Cerottini ont été très stimulantes ; qu'il en soit remercié ici. Nous tenons à remercier également Mlle Charlotte Anckers pour sa collaboration efficace et précise.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Avrameas, S., Taudou, B. & Chuilon, S., Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized o-dianisine as coupling agents in the passive hemagglutination. *Immunochem.*, 1969, **6**, 67-76.

[2] Cerottini, J. C., An antigen binding capacity test for human immunoglobulin G (IgG) fragments. *J. Immunol.*, 1968, **101**, 433-438.

[3] Farr, R. S., A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I BSA and antibody. *J. infect. Dis.*, 1958, **103**, 239-263.

[4] Hess, M. W., Sordat, B. & Stoner, R. D., Quantitative titration of anti-horseradish peroxidase antibody in mouse serum. *Immunochem.*, 1971, **8**, 509-515.

[5] Leduc, E. H., Avrameas, S. & Bouteille, M., Ultrastructure localisation of antibody in differentiating plasma cells. *J. exp. Med.*, 1968, **127**, 109-118.

[6] Leduc, E. H., Scott, G. B. & Avrameas, S., Ultrastructure localisation of intracellular immunoglobulins in plasma cells and lymphoblasts by enzyme labelled proteins. *J. Histochem. Cytochem.*, 1969, **17**, 211-221.

[7] Longmine, R. L., Smith, R. S., McMillan, R. & Reid, R. T., Quantitation of IgG by the ammonium sulfate technique. — I. Interference of the primary interaction between ^{125}I-Fc and rabbit antihuman Fc. *Immunochem.*, 1971, **8**, 141-153.

[8] Minden, P. & Farr, R. S., The ammonium sulfate method to measure antigen binding capacity, *in* « Handbook of experimental immunology » (D. M. Weir) (p. 463-492), Blackwell Scientific Publ., Oxford and Edinburgh, 1967.

[9] Nunez, J. & Pommier, J., Iodination des protéines par voie enzymatique. — III. Complexe intermédiaire enzyme-protéine et mécanisme de la réaction. *Europ. J. Biochem.*, 1969, **7**, 286-293.

[10] Sordat, B., Sordat, M. & Cottier, M., Localisation extra- et intracellulaire d'anticorps spécifiques anti-peroxydase dans les centres germinatifs du ganglion poplité de la souris. *C. R. Acad. Sci.* (Paris) (Sér. D), 1969, **268**, 1556-1558.

[11] Strauss, W., Cytochemical detection of sites of antibody to horseradish peroxidase in spleen and lymph nodes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1968, **16**, 237-248.

[12] Strauss, W., Localization of antigen in popliteal lymph nodes of rabbit during the formation of antibodies to horseradish peroxidase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, **18**, 131-142.

IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A. — LAVAL

Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)
1976, 127 C, 11-24

INFLUENCE DE DEUX TUMEURS PLASMOCYTAIRES SUR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE DE LA SOURIS

par **R. Seematter** et **H. Jaquet**

Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne
(Directeur : Pr H. Isliker), *Lausanne (Suisse)*

SUMMARY

The influence of plasmocellular tumours on the humoral immune response in mice

Syngeneic mice of the C3H/He strain have been inoculated with cells of the plasmocellular tumours X5563 and X5647, producing myeloma proteins of the IgG and IgA class respectively, and were immunized with (1) sheep red blood cells, (2) bovine serum albumin and (3) horseradish peroxydase. The immune responses of the various groups of mice were followed. The antibody activities towards all three antigens were decreased in mice carrying the IgG producing tumour X5563. This effect was correlated with an enhanced catabolism of IgG as well as with a decrease in number of IgG antibody producing cells. A reduced immune response was also observed in mice to which the IgA producing tumour X5647 had been transferred, but the effect was significantly less pronounced. There was no effect at all observed on the IgM response. The avidity which was measured for the various IgG antibodies was not modified by the presence of IgG nor IgA secreting myeloma tumours.

Key-words: Immunogenesis, Humoral immunity, IgG, IgA, IgM, Spleen, Lymphocyte, Myeloma, Erythrocyte, Peroxydase; Bovine seralbumin, Catabolism, Antigen binding capacity.

Manuscrit reçu le 1er août 1975, accepté le 30 décembre 1975.

INTRODUCTION

La réponse immunitaire est insuffisante chez les malades myélomateux ; ils sont sujets aux infections avant que l'état de cachexie ne puisse être tenu pour responsable d'une défense immunitaire diminuée. Zinnerman et Wendel [19], ainsi que Lawson et coll. [11] ont démontré la très forte incidence d'infections bactériennes chez ces patients [13] ; Heath et coll. [7] ont également montré que la réponse humorale était abaissée lors de l'immunisation avec différentes souches du virus de la grippe.

Les tumeurs plasmocytaires de la souris [15] permettent l'étude expérimentale de ce phénomène. Les tumeurs X5563 (sécrétrice d'IgG2a) et X5647 (sécrétrice d'IgA) transplantables sur des souris CH3/He ont été à la base de différents travaux prouvant l'influence de ces tumeurs sur l'immunité humorale : Smith et coll. [17], ainsi que Fahey et Humphrey [3] ont montré l'abaissement de la réponse en anticorps humoraux à l'égard de certains antigènes ; Carlson et coll. [1] ont également observé une diminution des lymphocytes stimulés dans la rate de ces souris, de même que Hirano et coll. [8], pour les souris porteuses de la tumeur X5563. Zolla [20] a étudié également la réponse immunitaire au niveau des cellules spléniques de souris porteuses d'autres tumeurs. Le catabolisme des immunoglobulines chez la souris porteuse d'un plasmocytome fut étudié par Humphrey et Fahey [9] et par Fahey et Sell [5].

Nous avons repris les tumeurs plasmocytaires X5647 et X5563 pour étudier la réaction humorale des souris porteuses C3H/He. D'une part, au moyen des globules rouges de mouton et par la technique des plages de lyse, nous avons mesuré la réaction primaire au niveau des cellules spléniques ; d'autre part, nous avons mesuré dans le sérum la réaction secondaire à l'égard d'antigènes solubles comme l'albumine bovine et la peroxydase de raifort.

Pour juger de l'incidence du catabolisme des anticorps, nous avons mesuré ce dernier au moyen d'une IgG marquée et injectée aux différents groupes de souris de notre système.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Animaux et tumeurs plasmocytaires*

Les tumeurs plasmocytaires X5467 et X5563 préalablement hachées ont été transplantées dans le tissu sous-cutané de souris C3H/He âgées de 4 mois en moyenne, selon Potter et Fahey [15]. Les deux tumeurs se développent à coup sûr quand l'inoculum est de 10^6 cellules ; elles se développent en 28 et en 40 jours

ABC = avidité (antigen binding capacity).
GRM = globule rouge de mouton.
BSA = séralbumine bovine.

respectivement pour les tumeurs plasmocytaires X5563 et X5647, et atteignent un poids de 5 g avant que la souris ne meure.

2) *Immunisation*

a) *Les globules rouges de mouton* (GRM) ont été mis en suspension à 2 % dans du soluté physiologique ; l'immunisation a consisté en une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de cette suspension.

b) *Albumine bovine* (BSA) : la première immunisation a été pratiquée dans la cavité péritonéale avec 0,2 mg de BSA électrophorétiquement pure (Behring Werke) dans 0,2 ml d'adjuvant de Freund complet ; le rappel a été effectué 21 jours plus tard avec 0,1 mg de BSA dans 0,2 ml d'adjuvant de Freund incomplet.

c) *Peroxydase de raifort* : l'immunisation a été effectuée selon le même schéma que celui utilisé pour la BSA, avec respectivement 75 et 15 μg de peroxydase (Purissima Fluka) dans un volume de 0,2 ml d'adjuvant de Freund complet ou incomplet.

3) *Marquage radioactif des protéines*

L'albumine a été marquée par ^{125}I selon la méthode de Hunter [10] avec ^{125}I libre de transporteur (Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen) ; l'activité spécifique obtenue était de 20 μCi/1 mg BSA. La peroxydase de raifort a été marquée selon la méthode de Seematter et Jaquet [16] ; l'activité spécifique obtenue était de 3 μCi ^{125}I/1 mg de peroxydase. L'IgG du myélome X5563 a été également marquée selon la méthode de Hunter [10] avec une activité spécifique de 10 μCi ^{125}I/mg d'IgG. Les mesures ont été faites avec un compteur proportionnel « Nuclear Chicago ».

4) *Activité des anticorps mesurée par leur avidité (antigen binding capacity, ABC)*

a) *Dans le cas de l'albumine*, les mesures ont été faites selon la méthode de Farr [6] et de Minden et Farr [14] en deux séries parallèles avec des concentrations de BSA correspondant à 0,1 μg et 0,01 μg d'azote/ml.

Nous avons employé la notation de Farr : ABC-33/0,1 qui désigne la quantité d'antigène que 1 ml d'immunsérum est capable de fixer dans des conditions d'excès d'antigène où seulement 33 % de l'antigène présenté sont précipités ; dans le cas particulier, la concentration de l'antigène présenté était de 0,1 μg d'azote/ml.

b) *Dans le cas de la peroxydase de raifort*, l'ABC a été mesurée avec une méthode adaptée à la solubilité de cet antigène dans le sulfate d'ammonium [16].

5) *Dénombrement des cellules lytiques de la rate*

Les souris ont été saignées avant d'être sacrifiées. La rate a été alors homogénéisée et suspendue dans du milieu d'Eagle, une courte centrifugation à 300 *g* pendant 2 secondes permettant de sédimenter les amas. Le surnageant a été alors centrifugé à 600 *g* pendant 10 minutes et le culot resuspendu dans le milieu d'Eagle. On a répété ensuite ce lavage 2 fois avant de procéder à la dilution adéquate des cellules.

La technique des plages de lyse (plages directes) a été effectuée selon la méthode de Cunningham et Szenberg [2]. Pour la mise en évidence des plages totales (directes et indirectes), nous avons utilisé un sérum de lapin anti-Fc d'IgG de souris.

Parallèlement, on a compté les lymphocytes de la suspension au moyen de la coloration vitale au bleu Trypan.

6) *Catabolisme des IgG*

L'IgG utilisée était la protéine sécrétée par la tumeur X5563, une IgG2a purifiée par relargage, chromatographie sur DEAE-cellulose et électrophorèse en gel de polyacrylamide. La protéine était pure d'après les critères de l'électrophorèse, avec un immunsérum de lapin dirigé contre du sérum de souris total.

Les souris ont été divisées en trois lots : 13 témoins, 11 porteuses de la tumeur X5563 greffées 12 jours avant l'injection de la protéine et 14 porteuses de la tumeur X5647 greffée 21 jours avant l'injection. Les périodes de 12 et 21 jours ont été choisies de façon à donner aux deux groupes de souris une survie de 10 jours au minimum. Dès le début de l'expérience, l'eau consommée par ces souris contenait de l'IK à 0,01 %.

L'IgG marquée a été injectée dans la veine caudale des différentes souris qui ont été saignées 39 h après l'injection, puis toutes les 24 h, par ponction dans le plexus rétro-orbitaire. On a obtenu chaque fois 50 µl de sang qui ont été précipités dans de l'acide trichloracétique à 20 % ; après centrifugation, on a mesuré la radio-activité dans le culot.

Chaque mesure a été prise séparément et, après correction par rapport à un standard contrôlé chaque jour, l'activité a été comptée en % de celle obtenue 39 h après l'injection de l'IgG.

7) *Dosage des IgG par immunodiffusion radiale*

Les IgG du sérum ont été dosées d'après Mancini et coll. [12]. Nous avons utilisé un immunsérum de lapin anti-IgG de souris absorbé avec de l'IgA de souris. Les courbes étalon faites avec de l'IgG normale et de l'IgG2a de la tumeur X5563 sont parfaitement superposables, ce qui exclut toute erreur systématique provoquée par l'IgG monoclonale.

RÉSULTATS

1) *Réponse humorale aux GRM*

Les souris ont été sacrifiées dès le 2e jour après l'immunisation, à raison de 5 ou 6 animaux par groupe et par jour ; la réponse a été mesurée en nombre de plages de lyse par 10^6 lymphocytes spléniques (Pl/10^6). La tumeur X5563, deux semaines après la greffe, a eu une influence marquée sur la réponse humorale provoquée par l'injection des GRM (fig. 1). Cette tumeur a provoqué un retard de la réponse le 3e jour après l'immunisation ($P < 0,01$). A partir du 5e jour, quand la réponse en IgG s'est développée, on peut voir que le nombre de plages totales a diminué significativement pour toutes les mesures effectuées du 5e au 7e jour ($P < 0,01$) ; le 6e jour, le degré de signification est moindre, car on a dû se contenter de 3 mesures pour les souris témoins ($P < 0,05$). En ce qui concerne les plages directes, on peut constater que, à partir du 4e jour, les souris porteuses de la tumeur et les témoins se sont comportées de la même façon.

La tumeur X5647, trois semaines après la greffe, a influencé également la réponse humorale aux GRM : le 3e jour après l'immunisation, en effet, on peut voir (fig. 2) que les souris porteuses de la tumeur ont réagi moins que les témoins ($P < 0,01$). Les jours suivants, par contre, la réponse en plages totales (directes ou indirectes) a été superposable pour les deux lots

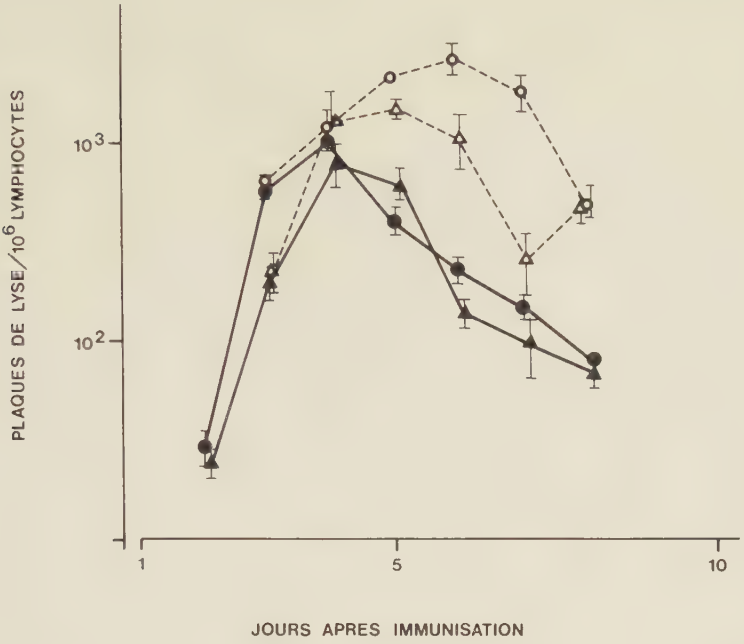

FIG. 1. — *Influence de la tumeur plasmocytaire X5563 (IgG2a) sur la réponse immunologique envers les GRM.* Le nombre de plages de lyse produites est mesuré pour 10^6 cellules spléniques.

▲——▲ : plages directes, Δ·····Δ : plages totales (directes et indirectes) des souris porteuses de la tumeur X5563.
●——● : plages directes, o·····o : plages totales (directes et indirectes) des souris témoins.

de souris, sauf le jour 5 où on a compté plus de plages directes chez les souris porteuses de la tumeur que chez les témoins ($P < 0,05$).

En considérant le nombre de lymphocytes par rate, on constate qu'il a été très variable chez les souris porteuses de la tumeur X5563 ; on ne peut pas distinguer une différence significative entre ces souris et les témoins. La situation est différente pour les souris porteuses de la tumeur X5647 qui ont présenté en moyenne $1,2 \times 10^7$ lymphocytes spléniques contre $0,6 \times 10^7$ pour les témoins.

Si on considère alors, pour ce lot de souris, le nombre de plages de lyse par rate (Pl/R), on voit (fig. 3) qu'il semble y avoir plus de plages totales chez les souris porteuses de la tumeur que chez les témoins les jours 5 et 6 après l'immunisation ; la différence n'est toutefois pas significative.

2) *Effet des tumeurs plasmocytaires sur le taux d'anticorps anti-BSA*

Deux semaines après l'injection de rappel, on a greffé les tumeurs X5563 et X5647, les souris ont alors été saignées régulièrement par ponction rétro-orbitaire. Chaque lot de souris — les témoins et les porteuses de tumeur —

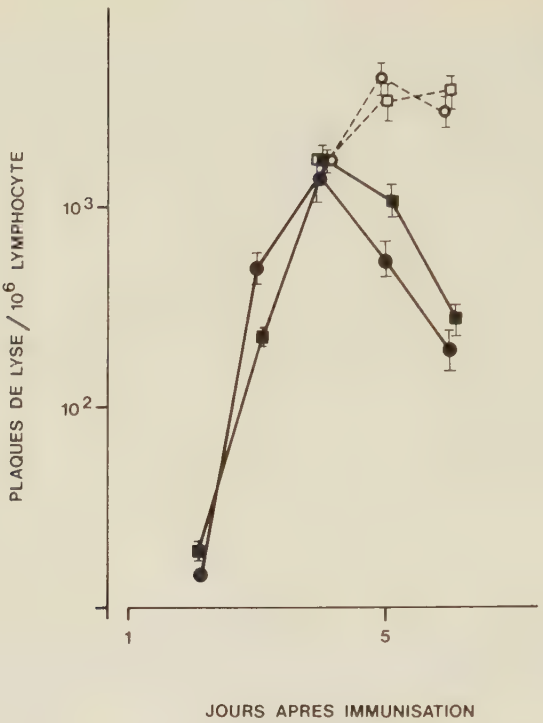

FIG. 2. — *Influence de la tumeur plasmocytaire X5647 (IgA) sur la réponse immunologique envers des GRM.* Le nombre de plages de lyses produites est mesuré pour 10^6 cellules spléniques.

■——■ : plages directes, □-------□ : plages totales (directes et indirectes) des souris porteuses de la tumeur X5647.
●——● : plages directes, ○-------○ : plages totales (directes et indirectes) des souris témoins.

comprend 12 animaux ; les sérums sont mélangés de sorte que chaque point de mesure représente la moyenne de 4 groupes de 3 souris prises au hasard.

Le tableau I montre que le taux d'anticorps anti-BSA a diminué progressivement chez les souris porteuses de la tumeur X5563, la différence étant significative à partir du 13e jour suivant la greffe ($P < 0,01$). Tout au long de l'expérience, on peut voir que le rapport ABC-33/0,01 sur ABC-33/0,1 qui est resté compris entre 20 et 30 % a été pratiquement le même chez les souris témoins et chez les porteuses du plasmocytome, lors de chaque mesure.

Le tableau II montre que le taux d'anticorps anti-BSA a diminué également chez les souris porteuses de la tumeur X5647, la différence étant significative à partir du 18e jour suivant la greffe ($P < 0,01$). Dans ce cas, aussi, on peut constater que le rapport entre les deux ABC mesurées a varié tout au long de l'expérience entre 15 et 20 % et est resté le même

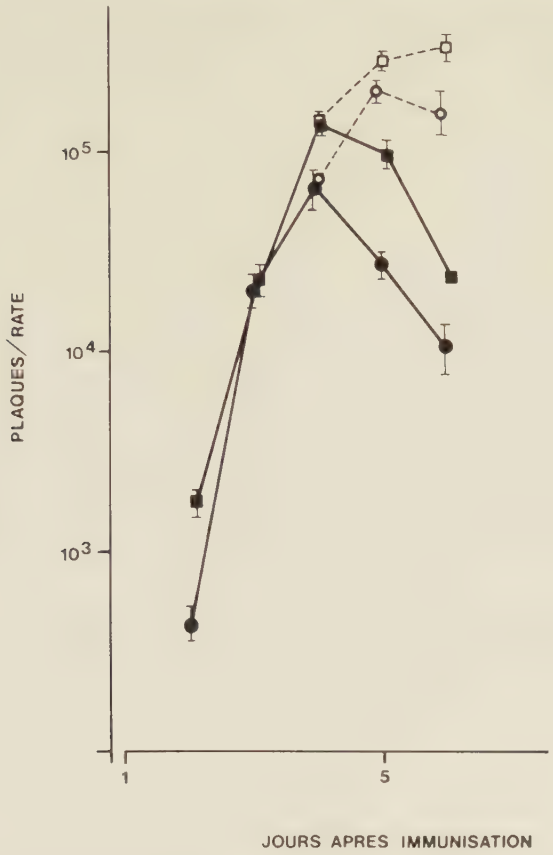

FIG. 3. — *Influence de la tumeur plasmocytaire X5647 (IgA) sur la réponse immunologique envers des GRM.* Le nombre de plages de lyse produites est mesuré par la rate.

■——■ : plages directes, □-------□ : plages directes et indirectes des souris porteuses de la tumeur X5647.
●——● : plages directes, ○-------○ : plages directes et indirectes de souris témoins.

lors de chaque mesure pour les souris porteuses de la tumeur et pour les témoins.

3) *Effet des tumeurs plasmocytaires sur le taux d'anticorps anti-peroxydase*

Comme dans le cas précédent, les tumeurs ont été greffées 2 semaines après le rappel de l'immunisation. Chaque lot comprend également 12 souris testées par groupes de 3.

Comme on peut le voir sur le tableau III, la tumeur X5563 a provoqué un abaissement significatif des taux à partir du 14e jour après la greffe ($P < 0{,}01$). Par contre, la tumeur X5647 n'a pas provoqué de diminution des taux (tableau IV).

TABLEAU I. — **Activité des anticorps anti-BSA de sérum de souris porteuses de la tumeur plasmocytaire X5563 (IgG2a).**

Nb de jours après la greffe de la tumeur	Souris témoins			Souris portant la tumeur X5563		
	ABC-33/0,1	ABC-33/0,01	$\frac{\text{ABC-33/0,01}}{\text{ABC-33/0,1}}$	ABC-33/0,1	ABC-33/0,01	$\frac{\text{ABC-33/0,01}}{\text{ABC-33/0,1}}$
0	89 ± 9	28 ± 4	0,31	76 ± 13	20 ± 4	0,26
3	121 ± 14	24 ± 4	0,19	124 ± 20	27 ± 4	0,21
8	191 ± 37	34 ± 5	0,17	111 ± 8	18 ± 1	0,16
13	116 ± 20	28 ± 6	0,24	37 ± 8	9 ± 1	0,24
17	132 ± 10	30 ± 5	0,22	17 ± 5	3 ± 1	0,17
24	85 ± 10	18 ± 2	0,21	6 ± 2	1 ± 0,5	0,16

L'activité des anticorps est représentée par leur ABC (antigen binding capacity); les valeurs indiquent la quantité d'antigène en µg d'azote précipitée par 1 ml d'immunsérum, selon la technique de Farr (1958).

Par l'utilisation de deux concentrations (0,1 µg/ml et 0,01 µg/ml) d'antigène, l'avidité relative des anticorps peut être estimée par la valeur du rapport de ces deux mesures.

TABLEAU II. — **Activité des anticorps anti-BSA de sérum de souris porteuses de la tumeur plasmocytaire X5647 (IgA).**

Nb de jours après la greffe de la tumeur	Souris témoins			Souris portant la tumeur X5647		
	ABC-33/0,1	ABC-33/0,01	$\frac{\text{ABC-33/0,01}}{\text{ABC-33/0,1}}$	ABC-33/0,1	ABC-33/0,01	$\frac{\text{ABC-33/0,01}}{\text{ABC-33/0,1}}$
0	100 ± 6	18 ± 1	0,18	102 ± 10	18 ± 1	0,17
4	86 ± 9	14 ± 1	0,16	79 ± 9	14 ± 1	0,17
8	62 ± 11	11 ± 2	0,17	48 ± 3	10 ± 1	0,20
13	67 ± 6	12 ± 1	0,17	43 ± 4	7 ± 1	0,16
18	58 ± 4	11 ± 1	0,18	32 ± 1	5 ± 0,5	0,15
22	44 ± 6	8 ± 1	0,18	19 ± 3	4 ± 0,5	0,21
31	43 ± 6	7 ± 1	0,16	13 ± 2	2 ± 0,5	0,15
38	43 ± 6	8 ± 2	0,18	8 ± 2	1,5 ± 0,2	0,18

Légendes : cf. celles du tableau I.

4) *Effet des tumeurs plasmocytaires X5563 et X5647 sur le catabolisme de l'IgG sécrétée par la tumeur X5563*

La disparition de la protéine marquée s'est faite à des vitesses différentes pour les 3 groupes de souris (fig. 4). Le calcul des droites de régression donne les valeurs correspondantes de demi-vie de la protéine : 9,3 jours (16 à 6,5 j ; $P < 0,05$) pour les témoins ; 20,4 jours (2,4 à 1,8 j ; $P < 0,05$) pour les souris porteuses de la tumeur X5563 et 3,7 jours (4,3 à 3,2 j : $P < 0,05$) pour les porteuses de la tumeur X5647.

TABLEAU III. — **Activité des anticorps anti-peroxydase de sérum de souris porteuses de la tumeur plasmocytaire X5563 (IgG2a).**

Nb de jours après la greffe de la tumeur	ABC-33/0,01	
	Souris témoins	Souris portant la tumeur X5563
0	0,25 ± 0,05	0,25 ± 0,1
5	0,25 ± 0,08	0,14 ± 0,03
14	0,51 ± 0,10	0,13 ± 0,06
18	0,28 ± 0,07	0,07 ± 0,01

L'ABC des anticorps anti-peroxydase n'est mesurée que pour une seule concentration d'antigène.

TABLEAU IV. — **Activité des anticorps anti-peroxydase de sérum de souris porteuses de la tumeur plasmocytaire X5647 (IgA).**

Nb de jours après la greffe de la tumeur	ABC-33/0,01	
	Souris témoins	Souris portant la tumeur X5647
0	0,58 ± 0,21	0,57 ± 0,04
8	1,86 ± 0,17	1,31 ± 0,48
12	2,87 ± 0,54	1,92 ± 0,26
18	3,06 ± 0,64	2,21 ± 1,07
23	2,43 ± 0,42	2,80 ± 0,36
29	2,08 ± 0,56	2,31 ± 0,52

Le dernier jour de l'expérience, les IgG ont été dosées dans le sérum de chaque souris : chez les témoins, on trouve un taux de 8,5 mg/ml (±0,62) ; chez les souris greffées avec la tumeur X5647, un taux de 12,9 mg/ml (± 0,7), tandis que chez les souris porteuses de la tumeur X5563, le taux est de 71 mg/ml (± 6,3).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les tumeurs plasmocytaires X5563 et X5647 de la souris C3H/He ont déjà été l'objet d'études semblables [3, 1, 8]. Elles offrent l'avantage d'avoir une cinétique comparable chez la même espèce de souris tout en étant différentes quant aux immunoglobulines sécrétées.

Le dénombrement des cellules lytiques de la rate indique que les deux tumeurs X5563 et X5647 provoquent un retard dans le développement de la réponse en IgM qui apparaissent, dans notre étude, le 3e jour après l'immunisation avec les GRM ; plus tard, la réponse en plages directes reste identique à celle des témoins. Pour la réponse en IgG, par contre,

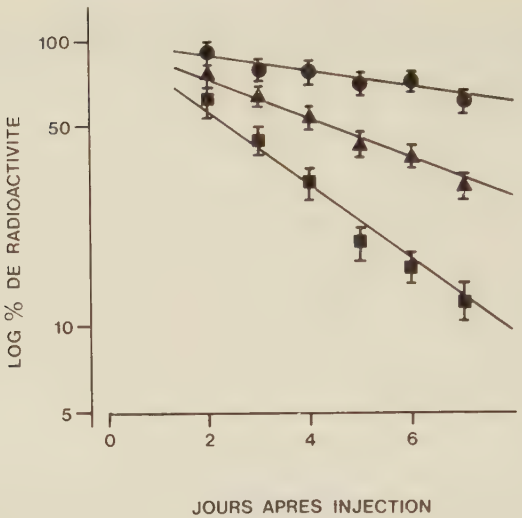

FIG. 4. — *Influence des tumeurs plasmocytaires X5563 (IgG2a) et X5647 (IgA) sur le catabolisme de la protéine myélomateuse X5563.*

■——■ : souris porteuses de la tumeur X5563 ;
▲——▲ : souris porteuses de la tumeur X5647 ;
●——● : souris témoins.

la tumeur X5563, sécrétrice d'IgG2a, provoque un abaissement significatif mesurable en plages totales, alors que la tumeur X5647, sécrétrice d'IgA, ne modifie pas la réponse.

Les deux tumeurs influencent différemment la rate des souris : chez les porteuses de la tumeur X5563, on ne trouve pas de différence significative avec les témoins ; par contre, la tumeur X5647 s'accompagne de splénomégalie avec un nombre de cellules 2 fois plus élevé que chez les témoins.

Ces résultats ne correspondent pas, en ce qui concerne la tumeur X5563, à ceux obtenus par Carlson et coll. [1] qui ont trouvé une diminution du nombre de plages directes, le 5e jour après l'injection des GRM ; cependant, la méthode d'immunisation est différente puisque les taux obtenus chez les témoins sont de 218 plages pour 10^6 lymphocytes ; il est d'ailleurs possible que, dans ce cas, le faible taux observé le 5e jour corresponde à celui observé le 3e jour dans notre étude. De même, Hirano et coll. [8], lors d'une immunisation avec des GRM injectés par voie veineuse, ont observé une diminution du taux des plages directes chez les souris X5563 les 2e, 4e et 6e jours après l'injection.

On peut donc conclure que les tumeurs X5563 et X5647 influencent la réponse primaire au niveau des plages de lyse directes (IgM), mais d'une façon qui dépend de la dose et de la voie d'administration.

Avec d'autres tumeurs plasmocytaires, Zolla [20] montre que l'effet de celles-ci est variable ; mais elle a uniquement constaté, avec certaines tumeurs, une dépression de la réponse en plages directes et elle n'a noté

aucune modification au niveau des plages indirectes. Là encore, la voie d'immunisation était différente et elle a permis une réaction de l'ordre de 10^5 à 10^6 plages de lyse par rate. D'autre part, les tumeurs utilisées par Zolla ont toutes provoqué chez les souris porteuses une forte augmentation de la taille de la rate et du nombre des cellules spléniques. Nous avons observé ce phénomène chez les souris porteuses de la tumeur X5647, mais non chez celles porteuses de la tumeur X5563, et c'est justement dans le premier cas que l'on n'observe pas d'influence de la tumeur, sur la réponse en plages indirectes (IgG).

Il peut donc s'agir de deux phénomènes spléniques locaux et concomitants : les tumeurs qui provoquent une augmentation du nombre de lymphocytes spléniques n'influencent pas la réponse en IgG, alors que dans le cas d'une diminution de ces cellules, la réponse de type IgG est perturbée. Il faut ajouter que Zolla a montré que chez ces souris, porteuses d'une tumeur plasmocytaire sous-cutanée, le nombre de plasmocytes tumoraux mis en évidence dans la rate reste négligeable [20].

Le catabolisme de l'IgG2a est lié aux demi-durées de vie différentes chez les trois groupes de souris que nous avons utilisées. En ce qui concerne les témoins, ces résultats sont différents de ceux de Fahey et Sell [5] et de Fahey et Robinson [4] ; la demi-durée de vie de 9 jours que nous observons pour les IgG2a des souris témoins est égale à celle décrite pour les souris « low pathogens » que ces auteurs ont utilisées, alors que chez les souris normales de leurs expériences la demi-durée de vie des IgG2a n'était que de 4 jours ; et bien que le taux d'IgG de nos souris témoins, de 0,8 g %, soit similaire à celui de leurs souris normales (des BALB/C dont le taux d'IgG est de 0,5 g %) [4], il n'est pas exclu que les méthodes d'iodination plus douces dont on dispose actuellement expliquent à elles seules l'observation de cette demi-durée de vie plus longue.

Dans les résultats que nous avons obtenus, l'accélération du catabolisme correspond bien à l'augmentation du taux d'IgG observée chez les deux groupes de souris porteuses de tumeurs [18] ; on doit se demander si l'augmentation des IgG chez les souris porteuses de la tumeur X5647 sécrétrice d'IgA correspond à une stimulation non spécifique due à la greffe ou à des éléments exogènes venus se mélanger au greffon.

La tumeur X5563 sécrétrice de la paraprotéine IgG a provoqué un abaissement des taux des anticorps anti-BSA et anti-peroxydase chez les souris préalablement immunisées de façon que, lors de la greffe, elles se trouvent dans une phase secondaire de leur réponse où la plupart des anticorps sont de type IgG.

Hirano et coll. [8] et Zolla [20] ont montré par la technique des plages de lyse que la réponse secondaire à l'égard des GRM n'était pas perturbée par les tumeurs plasmocytaires ; il faut donc supposer que, dans ce cas précis, l'augmentation du catabolisme des IgG est seule responsable de la baisse du taux d'anticorps.

La tumeur X5647 sécrétrice d'IgA provoque également un abaissement du taux des anticorps anti-BSA, correspondant bien à une accélération du catabolisme des IgG chez les souris porteuses de tumeur ; s'il s'agit là

de la seule explication, on comprend moins bien pourquoi le taux des anticorps anti-peroxydase reste constant. Pour cet antigène, il est évident, vu les faibles taux d'anticorps obtenus chez les témoins, que les conditions de stimulation ne sont pas optimales. Des phénomènes de régulation qui ne sont pas mis en évidence dans le cas de l'albumine peuvent donc intervenir.

La méthode de Farr permet de se faire une idée de l'avidité des anticorps mesurés. En effet, en variant la concentration de l'antigène présenté lors des mesures, on obtient des ABC différentes dont le rapport est un reflet de l'avidité des anticorps présentés [14].

Alors que nous assistons à une diminution de l'ABC des anticorps anti-BSA chez les souris porteuses de l'un ou de l'autre myélome, le rapport ABC-33/0,01 sur ABC-33/0,1 reste le même que pour les témoins. Nous en concluons que l'effet du myélome dans ce cas se limite à diminuer la concentration des anticorps décelables sans que leur type même soit modifié, ce qui se traduirait par des modifications de leur avidité.

En conclusion, nous avons observé deux mécanismes responsables de la baisse du taux d'anticorps chez les souris CH3/He porteuses des tumeurs plasmocytaires X5563 ou X5647. L'un, observable au niveau des cellules sécrétant des anticorps IgG, se traduit par une baisse des cellules formatrices de plages totales chez la souris porteuse de la tumeur X5563 sécrétrice d'IgG2a. L'autre, décelable en périphérie, est dû à un accroissement du catabolisme des IgG, plus marqué chez les souris porteuses de la tumeur X5563 qui agit spécifiquement en augmentant la concentration des IgG, alors que, chez les souris porteuses de la tumeur X5647 sécrétrice d'IgA, l'accélération du catabolisme des IgG nous semble due à une augmentation non spécifique des IgG.

RÉSUMÉ

Des souris syngénétiques C3H/He porteuses de la tumeur plasmocytaire X5563 (produisant des IgG) ou X5647 (produisant des IgA), ont été immunisées avec des globules rouges de mouton, ou de la séralbumine bovine, ou de la peroxydase de raifort. On observe que l'immunité humorale des souris porteuses de la tumeur X5563 est nettement diminuée. Cet abaissement de la réponse immunitaire peut être aussi bien dû à une augmentation du catabolisme des IgG qu'à une diminution du nombre de cellules produisant des anticorps IgG. Chez les souris porteuses de la tumeur X5647, par contre, on observe un abaissement de la réponse immunitaire nettement moins prononcé. Chez les souris porteuses de ces deux types de tumeur, il n'a été démontré aucun effet sur la réponse immunitaire en anticorps IgM. La présence de taux élevés de protéines myélomateuses de classe IgG ou IgA n'a provoqué aucune modification de l'avidité des différents anticorps de type IgG.

Mots-clés : Immunogenèse, Immunité humorale, IgG, IgA, IgM, Myélome, Rate, Lymphocyte, Peroxydase, Érythrocyte ; Séralbumine bovine, Catabolisme, Avidité.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à une subvention du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (3.605.71). Nous tenons à remercier Mlle Charlotte Anckers pour sa collaboration efficace et précise.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Carlson, P. J. & Smith, F., Effect of plasma cell tumor on antibody production by mouse spleen cells. *Proc. Soc. exp. Biol.* (N. Y.), 1968, **127**, 212-215.

[2] Cunnigham, A. J. & Szenberg, G. A., Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology*, 1968, **14**, 599-601.

[3] Fahey, J. L. & Humphrey, J. H., Effect of transplantable plasma-cell tumours on antibody response in mice. *Immunology*, 1962, **5**, 110-115.

[4] Fahey, J. L. & Robinson, A. G., Factors controlling serum-globulin concentration. *J. exp. Med.*, 1963, **118**, 845-868.

[5] Fahey, J. L. & Sell, S., The immunoglobulin of mice. — V. The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes. *J. exp. Med.*, 1965, **122**, 41-58.

[6] Farr, R. S., A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I BSA and antibody. *J. infect. Dis.*, 1964, **103**, 239-262.

[7] Heath, R. B., Hamilton-Fairley, G. & Malpas, J. S., Production of antibodies against viruses in leukemia and related diseases. *Brit. J. Haemat.*, 1964, **10**, 365-370.

[8] Hirano, S., Imamura, Y., Takaku, F. & Nakao, K., Immune response in mice with plasmocytoma tumor X-5563 assayed by agar plaque technique. *Blood*, 1968, **31**, 252-257.

[9] Humphrey, J. H. & Fahey, J. L., The metabolism of normal plasma proteins and gamma myeloma protein in mice bearing plasma cell tumors. *J. clin. Invest.*, 1961, **40**, 1696-1705.

[10] Hunter, W. M., The preparation of radio-iodinated proteins of high activity and their reaction with antibody *in vitro* : the radioimmunoassay , *in* « Handbook of experimental immunology » (D. M. Weir) (p. 608-654), Blackwell Scientific Publ., Oxford and Edinburgh, 1966.

[11] Lawson, H. A., Stuart, C. A., Paull, A. M., Phillips, A. M. & Phillips, R. W., Observation on the antibody content of the blood in patients with multiple myeloma. *New Engl. J. Med.*, 1955, **252**, 13-18.

[12] Mancini, G., Carbonara, A. O. & Heremans, J. F., Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, 1965, **2**, 235-254.

[13] Meyers, B. R., Hirschman, S. Z. & Axelrod, J. A., Current patterns of infection in multiple myeloma. *Amer. J. Med.*, 1972, **52**, 87-92.

[14] Minden, P. & Farr, R. S., The ammonium sulfate method to measure antigen binding capacity, *in* « Handbook of experimental immunology » (D. M. Weir) (p. 463-492), Blackwell Scientific Publ., Oxford and Edinburgh, 1967.

[15] Potter, M. & Fahey, J. L., Studies on eight transplantable plasma-cell neoplasms of mice. *J. nat. Cancer Inst.*, 1960, **24**, 1153-1162.

[16] Seematter, R. & Jaquet, H., Dosage de l'activité des anticorps antiperoxydase de raifort par la méthode au sulfate d'ammonium. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, **127 C**, 3-10.

[17] Smith, F., Grenan, M. M. & Owens, J., Effect of a transplanted plasma cell tumor on antibody formation. *J. nat. Cancer Inst.*, 1960, **25**, 803-812.

[18] Waldmann, T. A., Blaese, R. M. & Strober, W., Physiological factors controlling immunoglobulin metabolism *in* « Plasma protein metabolism » (M. A. Rothschild & T. A. Waldmann) (p. 269), Academic Press, New York and London, 1970.

[19] Zinnerman, H. H. & Wendel, H. H., Recurrent pneumonia in multiple myeloma and same observations in immunologic response. *Ann. int. Med.*, 1954, **41**, 1152-1163.

[20] Zolla, S., The effect of plasmocytomas on the immune response of mice. *J. Immunol.*, 1972, **108**, 1039-1048.

IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A. — LAVAL